

## 西地那非对 Caco-2 细胞增殖及对 NCM460 细胞炎症反应的影响

单静博<sup>1</sup>, 郭沛艳<sup>1</sup>, 陈特长<sup>1</sup>, 汪云阳<sup>1</sup>, 李晓祺<sup>1</sup>, 周 飒<sup>1</sup>, 马文建<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; <sup>2</sup>齐鲁理工学院生物工程系, 济南 250200)

**摘要** 为了探究西地那非对 Caco-2 细胞增殖的抑制作用及其对甲萘醌诱导的 NCM460 细胞炎症模型的抗炎作用, 采用 MTT 法测定细胞的增殖能力; 荧光探针法测定细胞内活性氧(ROS)及一氧化氮(NO)水平; Western blot 检测 Caco-2 细胞中 eNOS/ERK/JNK 通路相关蛋白表达水平及 NCM460 细胞中相关炎症因子的蛋白表达水平; 分光光度法测定西地那非对干酪乳杆菌及鼠李糖杆菌两种益生菌生长的影响。结果显示: 西地那非可显著抑制 Caco-2 细胞的增殖, 上调 Caco-2 细胞内 eNOS、p-eNOS、p-JNK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达水平。西地那非与 N<sup>G</sup>-L-硝基精氨酸甲酯(L-NAME)联用后, eNOS、p-eNOS、p-JNK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达水平较西地那非组明显降低。与甲萘醌组相比, 西地那非可明显降低 NCM460 细胞内 ROS 水平, 下调 IL-6、IL-1 $\beta$ 、p62、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平。且高浓度西地那非对干酪乳杆菌及鼠李糖杆菌并无明显毒性。研究结果表明: 西地那非在不破坏菌群稳态平衡的情况下, 有效地抑制了肠道细胞炎症反应, 通过抵抗外界条件引起的肠道细胞内的氧化应激反应, 预防结直肠癌的发生。

**关键词** 西地那非; 甲萘醌; 炎症反应; 一氧化氮; 活性氧; Caco-2 细胞; NCM460 细胞; 细胞增殖

**中图分类号** R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)01-0052-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200109

**引用本文** 单静博, 郭沛艳, 陈特长, 等. 西地那非对 Caco-2 细胞增殖及对 NCM460 细胞炎症反应的影响[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(1): 52-59.

**Cite this article as:** SHAN Jingbo, GUO Peiyan, CHEN Techang, et al. Effects of sildenafil on the proliferation of Caco-2 cells and inflammatory response in NCM460 cells[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(1): 52-59.

## Effects of sildenafil on the proliferation of Caco-2 cells and inflammatory response in NCM460 cells

SHAN Jingbo<sup>1</sup>, GUO Peiyan<sup>1</sup>, CHEN Techang<sup>1</sup>, WANG Yunyang<sup>1</sup>, LI Xiaoqi<sup>1</sup>, ZHOU Sa<sup>1</sup>, MA Wenjian<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457;

<sup>2</sup>College of Biotechnology, Qilu Institute of Technology, Jinan 250200, China

**Abstract** To investigate the inhibitory effect of sildenafil on Caco-2 cell proliferation and its anti-inflammatory effect on menadione-induced NCM460 cell inflammation model, MTT assay was used to determine cell proliferation. Intracellular reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) levels were detected by fluorescent probe. Western blot was used to detect the expression of eNOS/ERK/JNK pathway related proteins in Caco-2 cells and correlated inflammatory cytokines in NCM460 cells. The effect of sildenafil on the growth of two probiotics was determined by spectrophotometry. Results showed that sildenafil significantly inhibited the proliferation of Caco-2 cells and enhanced the expression levels of eNOS, p-eNOS, p-JNK1/2 and p-ERK1/2 proteins in Caco-2 cells; while after adding N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), the expression levels of eNOS, p-eNOS, p-JNK1/2 and p-ERK1/2 proteins were significantly lower than those of the sildenafil group. Compared with the menadione group, sildenafil significantly reduced ROS levels in NCM460 cells and inhibited the expression levels of IL-6, IL-

收稿日期 2019-08-03 \* 通信作者 Tel: 022-60602831 E-mail: ma\_wj@tust.edu.cn

基金项目 国家重点研发计划资助项目 (No. 2017YFD0400304); 山东省重点研发计划资助项目 (No. 2018GSF121016)

1 $\beta$ , p62, and TNF- $\alpha$ . Moreover, high concentrations of sildenafil had no obvious toxic effects on *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus*. Thus, the results indicated that sildenafil could effectively inhibit the intestinal inflammatory response without affecting the balance of the intestinal flora, and prevent colorectal cancer by reducing the oxidative stress responses in the intestinal cells.

**Key words** sildenafil; menadione; inflammatory response; nitric oxide; reactive oxygen species; Caco-2 cell; NCM460 cell; cell proliferation

This work was supported by the National Key R&D Program of China (No. 2017YFD0400304) and the Shandong Key R&D Program (No. 2018GSF121016)

近年来,结直肠癌(colorectal cancer, CRC)已经被列为全球第三大致命肿瘤,其发病率和病死率都持续增高<sup>[1]</sup>。全世界范围内每年有 140 万例新的结直肠癌病例,其中有 70 万患者死于结直肠癌<sup>[2]</sup>。绝大多数 CRC 与以下因素有关,如饮食、运动、体重、食物传播的诱变剂、特定的肠道菌群和慢性肠道炎症等<sup>[3]</sup>。通常,炎症性肠病(如溃疡性结肠炎或克罗恩病)患者发生结直肠癌的可能性比正常人高 2~5 倍<sup>[4-5]</sup>。根据流行病学研究,长期使用消炎药可以降低消化道肿瘤患者的病死率<sup>[6]</sup>。肠道内稳态的维持也依赖于肠道微生物耐受性和炎症状态之间的平衡<sup>[7]</sup>。

利用植物来源的化合物、维生素和营养补充剂进行的化学预防被认为是传统的肿瘤预防方法,但近年来,基于炎症在各种肿瘤形成过程中所发挥的作用,人们对其化学预防进行了更广泛的探索。结直肠癌作为一种常见的上皮性肿瘤,潜伏期近 20 年,在这段较长的时间内,化学预防对于抑制结直肠癌的转移可发挥作用<sup>[8-9]</sup>。氧化应激是目前已知的 CRC 的病因,通过 DNA 损伤和癌基因突变以及肿瘤细胞增殖途径而激活<sup>[10-11]</sup>。同时氧化应激是细胞与组织的氧化和抗氧化系统之间失衡及氧化自由基和相关活性氧过量产生的结果<sup>[10]</sup>。外源性天然抗氧化剂具有抗炎作用,可用于化学预防 CRC<sup>[12-15]</sup>。

在人体内,与邻近正常组织细胞相比,5 型磷酸二酯酶(PDE5)在结肠癌、膀胱癌、转移性乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌和肺癌等多种肿瘤中表达量相对较高<sup>[16]</sup>。西地那非(sildenafil)作为 PDE5 的选择性抑制剂,因其是第 1 个口服治疗男性勃起功能障碍药物而被人们所知。其结构与环磷酸鸟苷(cGMP)结构相似,通过与 PDE5 竞争性结合后,可显著提高 cGMP 水平,激活蛋白激酶 G(PKG),PKG 激活 AMPK 和 SIRT1,随后通过增强 PGC-1 $\alpha$  的活

性<sup>[17]</sup>,诱导抗氧化酶的表达,从而抑制活性氧(ROS)的产生<sup>[18]</sup>。这些研究表明 PDE5 可能在肿瘤发生中起重要作用,靶向 PDE5 可能是一种有广泛前景的抗肿瘤方法。西地那非能抑制 ROS 的产生,或许可用于化学预防 CRC。大量的研究表明,通过外源性 ROS 可以探究氧化应激的信号传导和细胞毒性反应<sup>[19]</sup>,但外源性 ROS 引起的氧化损伤难以直接产生生理状态下细胞所发生的生理反应。甲萘醌(menadione)是一种多环芳香族酮,可作为维生素 K 合成的前体,通过氧化还原体系不断在细胞体内产生 ROS,较高浓度的甲萘醌可诱发与组织损伤、线粒体 DNA 损伤和细胞死亡相关的氧化应激<sup>[20-22]</sup>。由于甲萘醌在细胞内可建立内源性 ROS,更易观察生理状态下细胞所发生的生理反应,因此本实验以西地那非为研究对象,以甲萘醌诱导 NCM460 细胞为肠道细胞炎症模型,探讨西地那非抵抗肠道炎症的作用,并研究其对肠道益生菌干酪乳杆菌和鼠李糖杆菌的生长影响,为其发挥肠道保护作用及预防结直肠癌作用提供实验依据及理论参考。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

西地那非(上海源叶生物科技有限公司);甲萘醌(美国 Selleck Chemicals 公司);活性氧检测试剂盒、一氧化氮检测试剂盒、N<sup>G</sup>-L-硝基精氨酸甲酯(N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)(上海碧云天生物技术有限公司);eNOS 抗体(北京 ImmunoWay 公司);p-eNOS 抗体(天津市莱博科技有限公司);p-JNK1/2 抗体、p-ERK1/2 抗体、p62 抗体(上海 Abcam 公司);IL-1 $\beta$  抗体、IL-6 抗体、TNF- $\alpha$  抗体(美国 Proteintech 公司); $\beta$ -actin 抗体(美国 Signalway Antibody 公司)。

## 1.2 仪器

CMax Plus 光吸收型单功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);紫外分光光度计(北京普析通用有限公司);Odyssey 红外激光成像系统(美国 LI-COR 公司);激光扫描共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 1.3 细胞

人源结肠上皮细胞 NCM460(上海慧颖生物科技有限公司);干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*, 本实验室保存);人源结肠癌细胞 Caco-2(中科院干细胞库/干细胞技术平台);鼠李糖乳杆菌 CICC6141(*Lactobacillus rhamnosus* CICC6141, 中国工业微生物菌种保藏管理中心)。

## 2 方法

### 2.1 西地那非和甲萘醌的配制

避光条件下分别称取一定量的西地那非和甲萘醌固体粉末于 EP 管中,加入 DMSO,摇晃使之充分溶解,使母液浓度为 100 mmol/L,过膜除菌后分装于 4 °C 保存。

### 2.2 西地那非对 NCM460、Caco-2 细胞增殖的影响

将 NCM460、Caco-2 细胞分别接种于 96 孔板下,5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 下过夜孵育,细胞覆盖率达到 70%~80% 时,设对照组和实验组进行实验,对照组不加西地那非,实验组用 10、20、40、80 μmol/L 西地那非分别处理细胞 24 h,MTT 法检测细胞增殖的能力:每组设 6 个复孔,培养结束后每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL,37 °C 培养箱避光继续培养 4 h,之后弃去培养液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO) 150 μL,在酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度。

### 2.3 西地那非对肠道细胞内 NO 及 ROS 水平的影响

将对数生长期的 NCM460、Caco-2 细胞分别接种于 6 孔板。待细胞贴壁生长后,设对照组和实验组进行实验。对照组不加西地那非,实验组选取 40 μmol/L 西地那非处理细胞 24 h,随后弃掉培养基,PBS 清洗 3 次。分别采用 DAF-FM DA 探针和 DCFH-DA 探针法检测细胞内 NO 和 ROS 水平:避光条件下,加入稀释好的探针 250 μL,置于 37 °C 培养箱孵育 20 min 后,弃掉荧光探针,用 PBS 洗涤 3~5 次,于共聚焦显微镜下分别选取激发波长 495 和 488 nm 进行观察,并拍照记录结果,检测细胞内 NO 和 ROS 水平。

### 2.4 西地那非对 Caco-2 细胞中 eNOS/ERK/JNK 通路的影响

将对数期的 Caco-2 细胞接种在 6 孔板中,至细胞覆盖率达到 80% 以上,弃掉上清,加入基础培养基 2 mL,设对照组、西地那非组、联合给药组,其中对照组不加药,西地那非组只加入西地那非(终浓度 40 μmol/L),联合给药组加入西地那非(终浓度 40 μmol/L)与 eNOS 抑制剂 L-NAME(终浓度 100 μmol/L)的混合液,各组分别处理细胞 24 h,用预冷的 PBS 清洗 3 次。Western blot 检测各组 eNOS、p-eNOS、p-JNK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达水平:每孔加入蛋白裂解液 150 μL,收集蛋白,将经过煮沸、冷却后离心的总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳(电泳参数:80 V、30 min;120 V、90 min),之后转移到硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶粉溶液将转好的硝酸纤维素膜(NC 膜)封闭 1 h,TBS 溶液洗涤 3 次,4 °C 条件下与相应一抗过夜孵育 15 h 以上。之后回收一抗,PBS 洗涤 3 次,加入二抗(1:5 000)5 mL 于常温条件下避光孵育 2 h,重复洗涤,将 NC 膜平铺于 Odyssey 红外激光成像系统中,设置程序,进行数据分析,采用 Image J 软件分析灰度值。

### 2.5 甲萘醌诱导肠道细胞建立炎症细胞模型

将对数生长期的 NCM460 细胞接种 6 孔板。细胞覆盖率达到 70%~80% 时,设对照组和实验组进行实验,对照组不加甲萘醌,实验组用 5、10、20 μmol/L 甲萘醌分别处理细胞 24 h,吸弃培养基,用 PBS 清洗 3 次,采取 DCFH-DA 探针,通过激光共聚焦显微镜及流式细胞术检测各组细胞内 ROS 水平。为验证实验结果准确性,增加药物处理浓度,同样设对照组和实验组进行实验,对照组不加甲萘醌,实验组用 2.5、5、10、20 μmol/L 甲萘醌分别处理 NCM460 细胞 24 h,用 Western blot 检测 NCM460 细胞各组 p62 蛋白表达水平。在分子水平上,为进一步证明甲萘醌可诱导肠道细胞的炎症反应,设对照组和实验组进行实验,对照组不加甲萘醌,实验组用 5、10 μmol/L 甲萘醌分别处理细胞 24 h,用 Western blot 检测 NCM460 细胞各组相关炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的蛋白表达水平。

为证明甲萘醌可以诱导肠道细胞建立炎症细胞模型,除 NCM460 细胞外,进一步验证甲萘醌也能引起结肠癌 Caco-2 细胞炎症反应,以此确定实验结果准确性。将 Caco-2 细胞接种于 6 孔板,细胞覆盖率

达到 70% ~ 80% 时,设对照组和实验组进行实验,对照组不加甲萘醌,实验组加入 10  $\mu\text{mol/L}$  甲萘醌处理细胞 24 h,用 DCFH-DA 探针,通过共聚焦显微镜检测各组 ROS 水平。用 Western blot 检测 Caco-2 细胞各组 p62 蛋白表达水平及相关炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的蛋白表达水平。

## 2.6 西地那非对甲萘醌诱导的 NCM460 细胞炎症模型的影响

将 NCM460 细胞接种于 96 孔培养板及 6 孔培养板中,设对照组、甲萘醌组、甲萘醌 + 西地那非组。其中对照组不加药,甲萘醌组只加入甲萘醌(终浓度 10  $\mu\text{mol/L}$ ),甲萘醌 + 西地那非组加西地那非(终浓度 40  $\mu\text{mol/L}$ )与甲萘醌(终浓度 10  $\mu\text{mol/L}$ )的混合液。各组处理细胞 24 h 后,MTT 法检测各组细胞活性。采用 DCFH-DA 探针,通过共聚焦显微镜和流式细胞术检测各组 ROS 水平。Western blot 检测各组 p62 蛋白表达水平及相关炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的蛋白表达水平。

## 2.7 西地那非对两种肠道益生菌生长的影响

取干酪乳杆菌与鼠李糖乳杆菌的菌液各 2 mL,分别接种至 MRS 液体培养基 100 mL 中,各自设实验分组为对照组和实验组。对照组不加药,实验组用 250、500  $\mu\text{mol/L}$  西地那非处理,每组实验设 3 个平行,37  $^{\circ}\text{C}$  摇床培养,在第 0、2、4、6、8、12、24、36 h 时,采用紫外分光光度计在 600 nm 波长处测定各组吸收度,取平均值。以菌体悬液的吸收度(A)为纵坐标,培养时间为横坐标,分别绘制干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的生长曲线图。

## 2.8 统计分析

采用 GraphPad Prism 5.0 分析软件进行统计分析,各项指标均以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验比较各组间显著性差异, $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

# 3 结果

## 3.1 西地那非对 NCM460、Caco-2 细胞增殖的影响

用不同浓度的西地那非分别作用 NCM460、Caco-2 细胞 24 h 后,MTT 检测结果表明,西地那非对 Caco-2 细胞增殖的抑制效果比对结肠上皮细胞 NCM460 增殖的抑制效果更为显著,由于 80  $\mu\text{mol/L}$  西地那非对 NCM460 细胞仍有较强毒性作用,且 10 和 20  $\mu\text{mol/L}$  西地那非对 Caco-2 细胞致死率均未

过半,故选择 40  $\mu\text{mol/L}$  作为西地那非的处理浓度开展后续实验(图 1)。

## 3.2 西地那非对肠道细胞内 NO 及 ROS 水平的影响

由图 2 所示,西地那非处理 24 h 后,可以增强 NCM460 细胞(图 2-A)及 Caco-2 细胞(图 2-B)内的 NO 水平,同时降低胞内 ROS 水平,提示西地那非有可能通过增强细胞内 NO 水平,抵抗肠道细胞内的氧化应激,预防结直肠癌的发生。

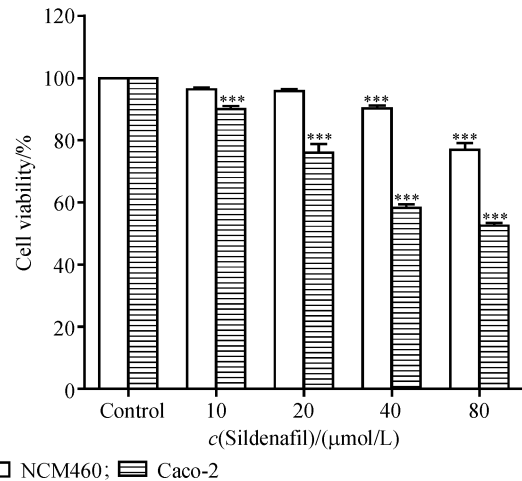


Figure 1 Inhibition of sildenafil on the proliferation of NCM460 and Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

\*\*\*  $P < 0.001$  vs control group

## 3.3 西地那非对 eNOS/ERK/JNK 通路的影响

如图 3 所示,西地那非处理 Caco-2 细胞 24 h 后,经 Western blot 检测,与对照组比较,西地那非组 Caco-2 细胞中 eNOS、p-eNOS、p-JNK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达水平显著上调。与西地那非组相比,西地那非与 L-NAME 联合用药组中 eNOS、p-eNOS、p-JNK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达水平明显下调,提示西地那非对于结直肠癌的抑制效果可能与 eNOS/ERK/JNK 通路相关。

## 3.4 甲萘醌诱导肠道细胞建立炎症细胞模型

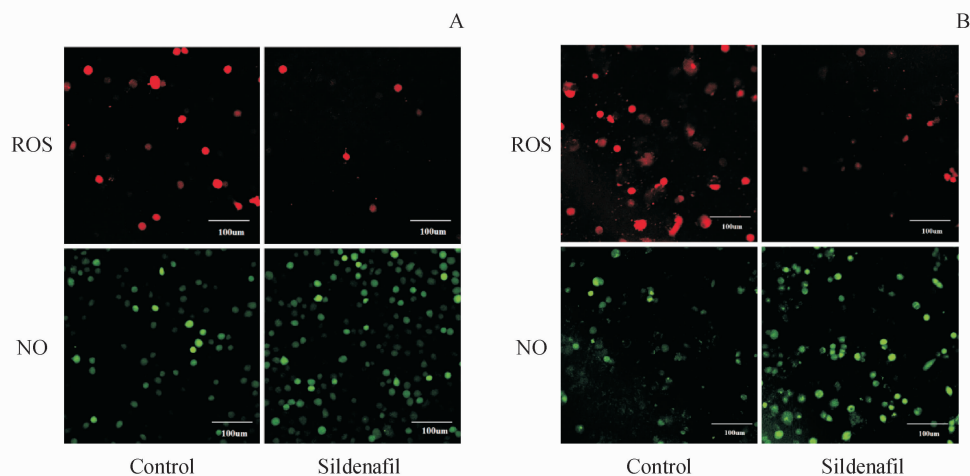
用不同浓度的甲萘醌处理 NCM460 细胞 24 h,经激光共聚焦显微镜观察(图 4-A)及流式细胞术检测(图 4-B),NCM460 细胞内 ROS 水平升高,且呈现剂量相关性。Western blot 检测结果表明,甲萘醌可以上调 NCM460 细胞内 p62 蛋白表达水平(图 4-C)及相关炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的蛋白表达水平(图 4-D)。为进一步验证以上实验结果,用 10  $\mu\text{mol/L}$  甲萘醌处理 Caco-2 细胞 24 h,激光共聚焦显微镜检测结果表明,甲萘醌可以诱导

Caco-2 细胞内 ROS 水平升高(图 4-E)。Western blot 检测结果表明,甲萘醌可以上调 Caco-2 细胞内 p62 蛋白表达水平及相关炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的蛋白表达水平(图 4-F)。以上结果表明甲萘醌可以通过诱导肠道细胞建立炎症模型。

### 3.5 西地那非对甲萘醌诱导的 NCM460 细胞炎症模型的影响

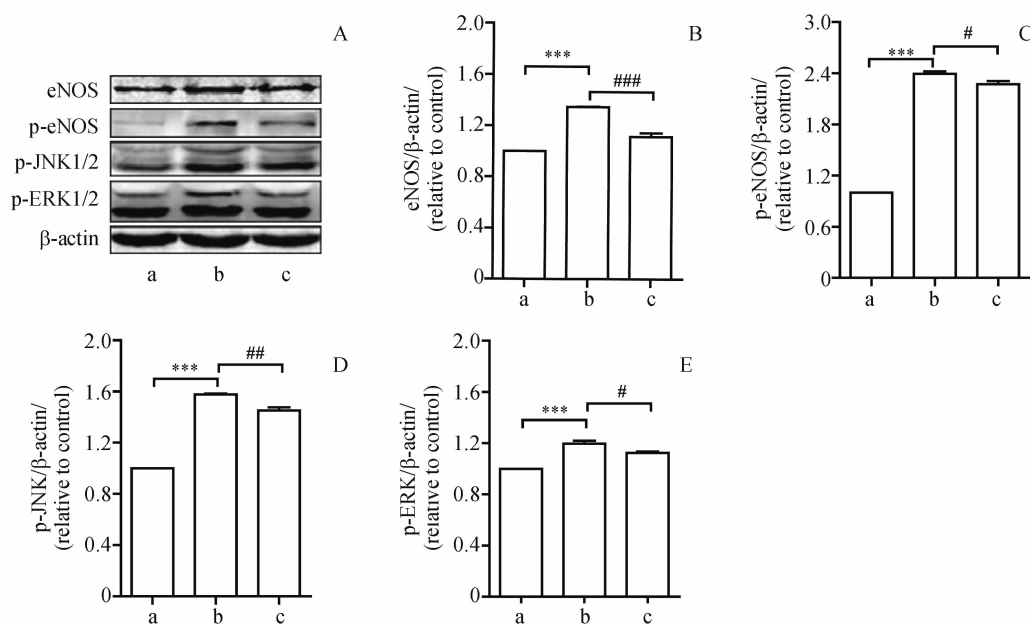
与甲萘醌组相比,MTT 实验结果表明,甲萘

醌 + 西地那非组可降低甲萘醌对细胞的毒性(图 5-A)。激光共聚焦显微镜(图 5-B)及流式细胞术检测(图 5-C)结果表明,甲萘醌 + 西地那非组可降低了细胞内 ROS 水平。Western blot 检测结果表明,甲萘醌 + 西地那非组下调了 p62、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  蛋白表达水平(图 5-D)。表明西地那非可缓解甲萘醌诱导的细胞炎症,减轻甲萘醌对肠上皮细胞的毒性。



**Figure 2** Effect of sildenafil on the level of ROS and NO in intestinal cells

A: NCM460 cells; B: Caco-2 cells

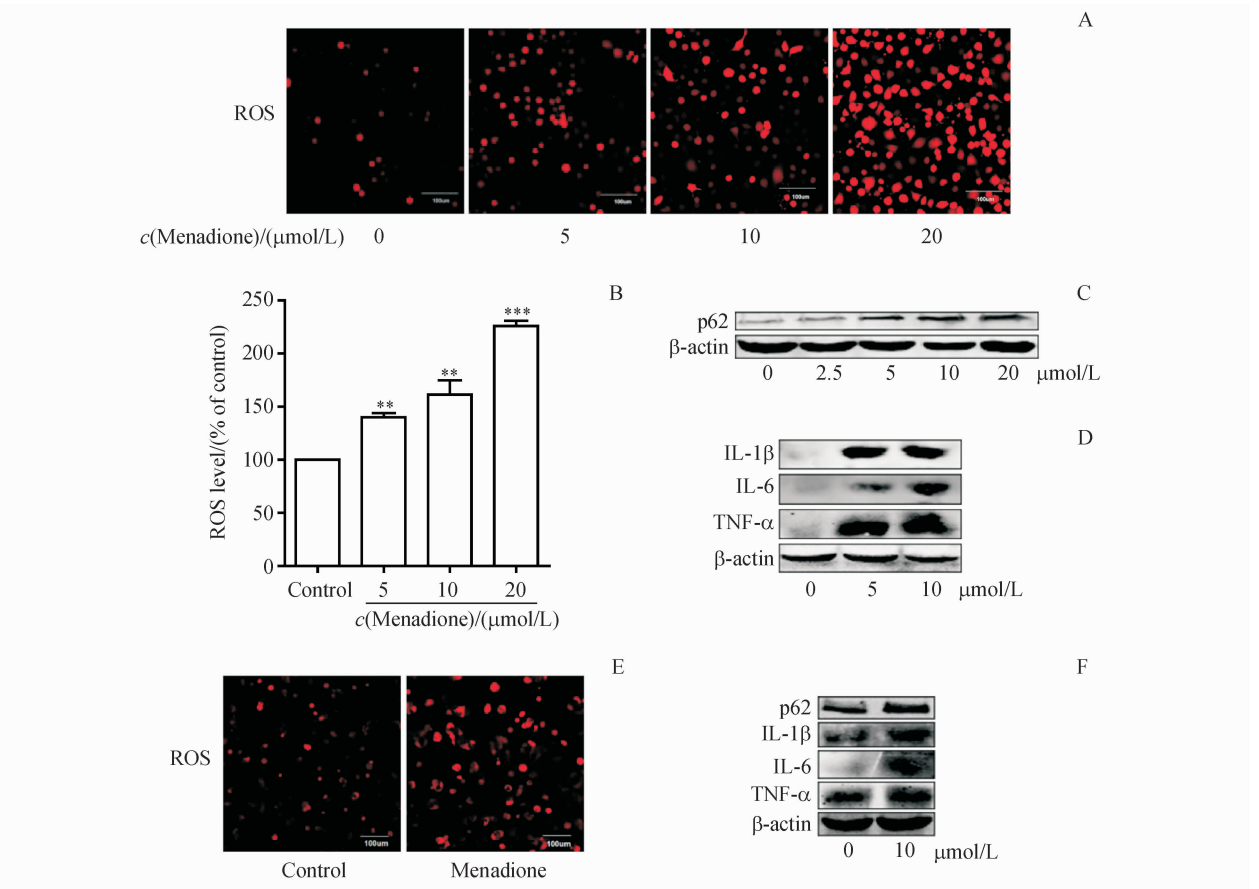


**Figure 3** Effect of sildenafil on the eNOS/ERK/JNK pathway in Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

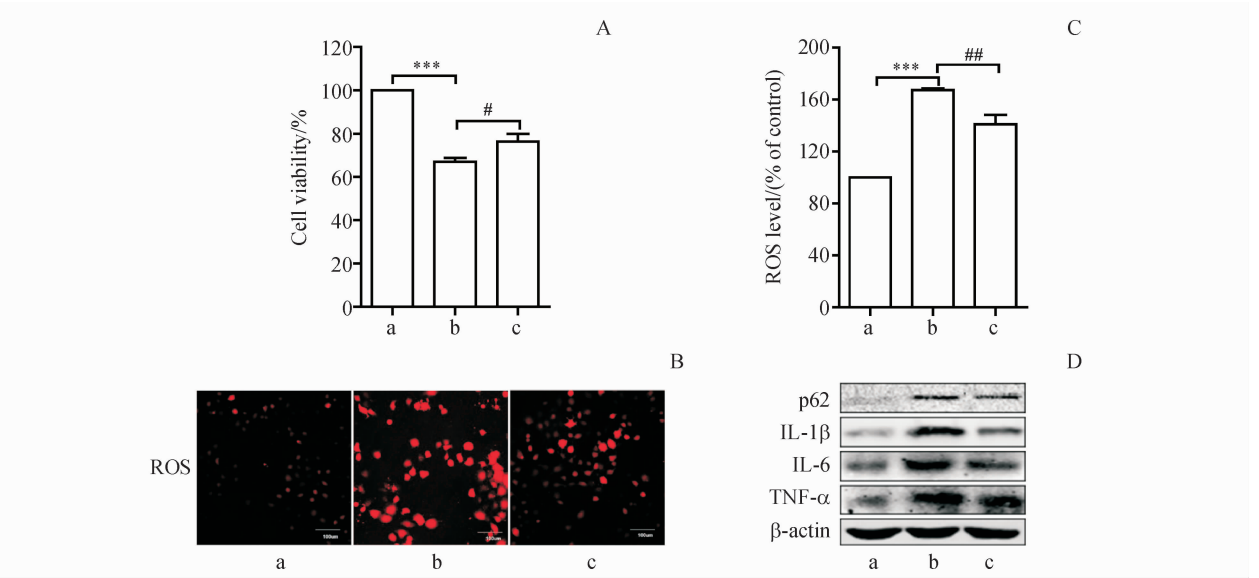
A: Expressions of eNOS, p-eNOS, p-JNK1/2, p-ERK1/2 in Caco-2 cells detected by Western blot; B, C, D, E: Quantitative analysis of protein levels of eNOS, p-eNOS, p-JNK1/2, p-ERK1/2

a: Control; b: Sildenafil; c: Sildenafil + N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester

\*\*\*  $P < 0.001$  vs control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs sildenafil group



**Figure 4** Menadione induced intestinal cells to establish an inflammatory model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
A: Effect of menadione on the level of ROS in NCM460 cells detected by laser scanning confocal microscopy (LSCM); B: Quantitative analysis of the level of ROS in NCM460 cells by flow cytometry ( $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs control group); C, D: Effect of menadione on the expressions of p62 (C) and IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  (D) in NCM460 cells detected by Western blot; E: Effect of menadione on the level of ROS in Caco-2 cells detected by LSCM; F: Effect of menadione on the expressions of p62, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in Caco-2 cells detected by Western blot



**Figure 5** Effects of sildenafil on inflammatory model of NCM460 cells induced by menadione ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
A: Cell proliferation detected by MTT; B: Levels of ROS detected by LSCM; C: Quantitative analysis of levels of ROS detected by flow cytometry; D: Expression of p62, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  detected by Western blot  
a: Control; b: Menadione; c: Menadione + Sildenafil  
 $***P < 0.001$  vs control group;  $#P < 0.05$ ,  $##P < 0.01$  vs menadione group



### 3.6 西地那非对两种肠道益生菌生长的影响

将不同浓度的西地那非处理干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌 36 h, 结果表明加入高浓度西地那非对

干酪乳杆菌(图 6-A)和鼠李糖乳杆菌(图 6-B)的生长并无明显影响, 证明了西地那非可能在不影响肠道菌群稳态的情况下, 发挥抑癌效果。

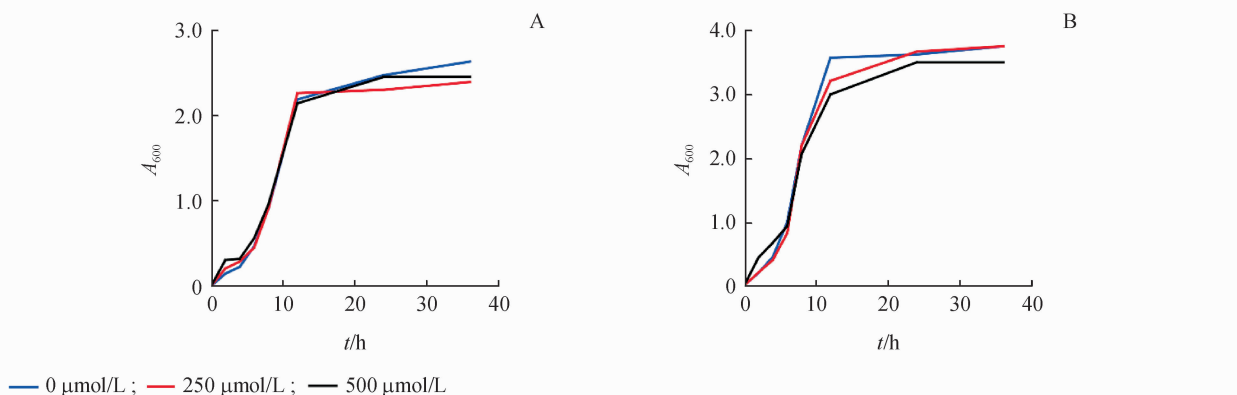


Figure 6 Effects of sildenafil on the growth of *Lactobacillus casei* (A) and *Lactobacillus rhamnosus* (B)

## 4 讨论

Sharman 等<sup>[23]</sup>研究发现西地那非可以显著降低小鼠患结直肠癌的风险。同时有研究表明 NO 可通过上调 p-ERK1/2 的表达水平诱导肝癌细胞凋亡<sup>[24]</sup>。本研究结果表明, 西地那非对正常结肠上皮细胞无明显毒性, 但是对于 Caco-2 细胞有明显的抑制作用, 同时西地那非可以提高肠道细胞内 NO 水平, 通过上调内皮型一氧化氮合成酶 (eNOS) 的蛋白表达水平, 激活磷酸化的细胞外信号调节激酶 (p-ERK1/2) 及磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 1/2 (p-JNK1/2), 这可能是西地那非抑制 Caco-2 细胞生长的主要原因。

有研究表明, 西地那非存在抗炎潜能<sup>[25]</sup>。本研究证明西地那非可降低肠道细胞内的 ROS 水平, 进而降低结直肠癌发生的概率。当外界不良因素进入体会影响免疫系统和胃肠道细胞, 在分子水平上触发与炎症相关的信号传导途径, 同时诱导促炎细胞因子的反式激活, 如肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 (IL-1 $\beta$ ) 和白细胞介素 6 (IL-6), 其表达增加可能导致细胞损伤甚至凋亡。p62 是一种多功能、应激诱导的支架蛋白, 参与多种细胞过程, 包括自噬清除、炎症反应调节和氧化还原稳态, 研究证明 p62 与线粒体功能和炎性小体活化有关<sup>[26]</sup>。本研究采用甲萘醌处理 NCM460 细胞及 Caco-2 细胞 24 h, 发现甲萘醌可剂量依赖性地升高细胞内 ROS 水平, 同时上调 p62、IL-6、IL-1 $\beta$  及

TNF- $\alpha$  蛋白表达水平, 因此建立了甲萘醌诱导结肠上皮细胞的炎症模型, 这对今后模拟外界环境因素诱导肠道炎症模型提供了实验参考。最后本研究证明西地那非与甲萘醌联合作用于细胞, 可减缓甲萘醌对细胞的毒性, 进一步证明了西地那非可以有效地改善肠道细胞炎症反应, 通过抵抗外界条件引起的氧化应激反应, 预防结直肠癌的发生。

有研究证明干酪乳杆菌<sup>[4,27]</sup>和鼠李糖乳杆菌<sup>[28–30]</sup>都具有抗炎及维持肠道菌群平衡的作用。本研究证明西地那非对干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的生长无不良影响。这些结果提示西地那非可能在不破坏菌群平衡的状态下, 能够有效地改善肠道细胞炎症反应, 通过改善外界条件引起的氧化应激反应, 预防结直肠癌的发生。

## 参考文献

- [1] Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12 (10): 661–672.
- [2] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144 (8): 1941–1953.
- [3] Janakiram NB, Rao CV. The role of inflammation in colon cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 816: 25–52.
- [4] Aguilar-Toalá JE, Hall FG, Urbizo-Reyes UC, et al. *In silico* prediction and *in vitro* assessment of multifunctional properties of postbiotics obtained from two probiotic bacteria [J]. *Probiotics Antimicro Prot*, 2019. doi:10.1007/s12602-019-09568-z.
- [5] Ferrone C, Dranoff G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28 (26): 4045–4051.

- [6] Hafner C, Reichle A, Vogt T. New indications for established drugs: combined tumor-stroma-targeted cancer therapy with PPAR $\gamma$  agonists, COX-2 inhibitors, mTOR antagonists and metronomic chemotherapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, **5** (6):393–419.
- [7] Assumpção JAF, Magalhães KG, Corrêa JR. The role of ppar $\gamma$  and autophagy in ros production, lipid droplets biogenesis and its involvement with colorectal cancer cells modulation[J]. *Cancer Cell Int*, 2017, **17**(1):82.
- [8] Redondo-Blanco S, Fernández J, Gutiérrez-Del-río I, et al. New insights toward colorectal cancer chemotherapy using natural bioactive compounds[J]. *Front Pharmacol*, 2017, **8**:109.
- [9] Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, et al. The rising incidence of younger patients with colorectal cancer: questions about screening, biology, and treatment[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2017, **18**(4):23.
- [10] Samoylenko A, Hossain JA, Mennerich D, et al. Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: from mechanisms to biomarkers and clinical evidence[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, **19**(17):2157–2196.
- [11] Jantan I, Ahmad W, Bukhari SN. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials[J]. *Front Plant Sci*, 2015, **6**:655.
- [12] Fatfat M, Merhi RA, Rahal O, et al. Copper chelation selectively kills colon cancer cells through redox cycling and generation of reactive oxygen species[J]. *BMC Cancer*, 2014, **14**:527.
- [13] van der Stok EP, Spaander MCW, Grünhagen DJ, et al. Surveillance after curative treatment for colorectal cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, **14**(5):297–315.
- [14] Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, et al. Role of antioxidants and natural products in inflammation[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, **2016**:5276130.
- [15] Arulselvan P, Wen CC, Lan CW, et al. Dietary administration of scallion extract effectively inhibits colorectal tumor growth: cellular and molecular mechanisms in mice[J]. *PLoS One*, 2012, **7** (9):e44658.
- [16] Das A, Durrant D, Salloum FN, et al. PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, **147**:12–21.
- [17] Koka S, Aluri HS, Xi L, et al. Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 with tadalafil attenuates mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic hearts: potential role of NO/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signaling[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, **306**(11):H1558–H1568.
- [18] García-Quintans N, Sánchez-Ramos C, Tierrez A, et al. Control of endothelial function and angiogenesis by PGC-1 $\alpha$  relies on ROS control of vascular stability[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, **75** (Suppl 1):S5.
- [19] Xie H, Zhou FB, Liu L, et al. Vitiligo: how do oxidative stress-induced autoantigens trigger autoimmunity[J]? *J Dermatol Sci*, 2016, **81**(1):3–9.
- [20] Grishko V, Solomon M, Wilson GL, et al. Oxygen radical-induced mitochondrial DNA damage and repair in pulmonary vascular endothelial cell phenotypes[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, **280**(6):L1300–L1308.
- [21] Choi YH, Schisandrin A prevents oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis by attenuating ROS generation in C2C12 cells[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, **106**:902–909.
- [22] Sakagami H, Satoh K, Hakeda Y, et al. Apoptosis-inducing activity of vitamin C and vitamin K[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2000, **46**(1):129–143.
- [23] Sharman SK, Islam BN, Hou YL, et al. Cyclic-GMP-elevating agents suppress polyposis in Apc<sup>Min</sup> mice by targeting the preneoplastic epithelium[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2018, **11**(2):81–92.
- [24] Liu ZY, Niu ZY, Zheng W, et al. Effects of p-ERK1/2 on nitric oxide donor induced apoptosis of HepG2 cells[J]. *J Chin Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2012, **43**(6):530–534.
- [25] Yasmeen S, Akram BH, Hainsworth AH, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) and endothelial function in ischaemic stroke. A review[J]. *Cell Signal*, 2019, **61**:108–119.
- [26] Guo WY, Gu XL, Tong YQ, et al. Protective effects of mannan/ $\beta$ -glucans from yeast cell wall on the deoxynivalenol-induced oxidative stress and autophagy in IPEC-J2 cells[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **135**:619–629.
- [27] Alegre F, Moragrega ÁB, Polo M, et al. Role of p62/SQSTM1 beyond autophagy: a lesson learned from drug-induced toxicity in vitro[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, **175**(3):440–455.
- [28] Cordeiro BF, Oliveira ER, da Silva SH, et al. Whey protein isolate-supplemented beverage, fermented by *Lactobacillus casei* BL23 and *Propionibacterium freudenreichii* 138, in the prevention of mucositis in mice[J]. *Front Microbiol*, 2018, **9**:2035.
- [29] Seenappanahalli Nanjundaiah Y, Wright DA, Baydoun AR, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG conditioned media modulates acute reactive oxygen species and nitric oxide in J774 murine macrophages[J]. *Biochem Biophys Rep*, 2016, **6**:68–75.
- [30] Pagnini C, Corleto VD, Martorelli M, et al. Mucosal adhesion and anti-inflammatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human colonic mucosa: a proof-of-concept study[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, **24**(41):4652–4662.